

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА
КАФЕДРА ЗООЛОГІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ ТВАРИН

Різноманіття розмірів сперматозоїдів *Pelophylax esculentus* complex з різних типів
геміклональних популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб

Курсова робота
студентки III курсу
біологічного факультету
Степаненко К. Р.

Науковий керівник:
д.б.н., професор
кафедри зоології та екології тварин
ХНУ імені В. Н. Каразіна
Шабанов Д. А.

Харків, 2018

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	6
1.1 Гібридна стерильність та механізми її уникнення	6
1.2 Геміклональне відтворення	8
1.3 <i>Pelophylax esculentus</i> complex як модельний об'єкт для вивчення геміклонального відтворення	9
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ.....	12
2.1 Методи дослідження	12
2.2 Обробка результатів.....	13
2.3 Матеріал дослідження.....	14
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	15
3.1 Зв'язок між розмірами сперматозоїдів та кількістю ДНК, яку вони містять ..	15
3.2 Розмірні розподіли сперматозоїдів	16
3.2 Багатофакторний дисперсійний аналіз	17
3.3 Тест Тьюкі	17
ВИСНОВКИ	20
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	21

ВСТУП

Гібриди, що утворюються в ході схрещування представників різних видів тварин, часто вимушені боротися з проявами гібридної стерильності. Відомо про три різних механізми подолання гібридної стерильності: поліплоїдизація, клональне та геміклональне відтворення. Також існують приклади поєднання різних механізмів (Шабанов, 2015).

Вивчення геміклональності та пов'язаних з нею феноменів має значення як для фундаментальної, так і для прикладної науки.

Значення даної проблеми для фундаментальної науки стає очевидним у контексті проблеми виникнення і переваг статевого розмноження. Так, вважається, що основною перевагою статевого розмноження є можливість рекомбінації генетичної інформації (Maynard Smith, 1971). За рахунок рекомбінації прискорюється природний добір (Fisher, 1930), підвищується здатність протистояти паразитам (Hamilton, 1980), а також, відбувається елімінація шкідливих мутацій з генофонду популяції (Muller, 1932). На цьому тлі довготривале відтворення складних організмів, що несуть нерекомбінантні (клональні) геноми викликає жвавий інтерес.

З точки зору прикладної науки геміклональність цікава як спосіб уникнення гібридної стерильності та як інструмент для редагування генотипу. Так, розуміння молекулярно-генетичного механізму виникнення геміклональності та розробка методів її індукції дала би змогу отримувати фертильні гібриди промислово важливих тварин, а також зберігати та передавати у ряду поколінь без змін (клонально) цільовий геном.

Pelophylax esculentus (Linnaeus, 1758), або їстівна жаба – гібрид *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) та *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), що відтворюється геміклонально та є поширеним в Європі, та зокрема, в Україні (Plötner, 2005), завдяки чому їстівна жаба є зручним модельним об'єктом для вивчення геміклонального відтворення та феноменів, пов'язаних з ним.

В деяких геміклональних популяційних системах (ГПС) зелених жаб поряд з диплоїдними гібридами існують також й триплоїдні *P. esculentus*. Так, це характерно для Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex (Шабанов та ін., 2009, Поширення..., 2017). Частка триплоїдних особин може коливатися в різних вибірках, що були зібрані в цьому центрі, починаючи з 2002 р., від 10,5 до 21,7 % (Mass occurrence..., 2004; Массовая полиплоидия..., 2005; Устойчивость сперматогенеза... , 2016). У всіх вивчених випадках триплоїди виникають в результаті продукції батьківськими особинами диплоїдних гамет. Зареєстрована продукція диплоїдними самками *P. esculentus* диплоїдних яйцеклітин (Crossing experiments..., 2015), однак частка таких яйцеклітин нижча, ніж частка триплоїдів в ГПС (Вибіркова..., 2018).

Відтак, було висунуто припущення, що частина триплоїдів виникає в результаті запліднення яйцеклітин диплоїдною спермою. Виходячи з того, що для більшості організмів кількість ДНК в клітині корелюють з її розмірами (Gregory, 2001a), додаткові піки на розмірних розподілах сперматозоїдів можуть вказувати на наявність аномальних (анеуплоїдних та диплоїдних) сперматозоїдів.

Одним з феноменів, пов'язаних з геміклональним відтворенням зелених жаб, є численні порушення під час гаметогенезу, зокрема, сперматогенезу (Бірюк, 2017), що цілком узгоджується з правилом Холдейна (Haldane, 1922), згідно з яким порушення фертильності під час гібридизації мають переважно представники гетерогаметної статі (у випадку жаб - самці).

Мета даної роботи — порівняти розмірні розподіли сперматозоїдів зелених жаб з різних типів геміклональних популяційних систем та виявити фактори, що на них впливають.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні **задачі**:

1. Зібрати вибірки самців зелених жаб з різних типів ГПС; приготувати препарати сперматозоїдів за попередньо розробленою методикою; побудувати та проаналізувати розмірні розподіли сперматозоїдів.
2. Виявити фактори, що впливають на розмір сперматозоїдів зелених жаб і появу додаткових піків, із застосуванням багатофакторного дисперсійного аналізу.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Гібридна стерильність та механізми її уникнення

У процесі видоутворення гібридизація грає важливу, хоча й неоднозначну роль. У деяких випадках гібридизація може сповільнювати утворення нових видів, адже може призводити до потоку генів або рекомбінації (Hybridization..., 2013). В інших випадках, гібридизація може сприяти видоутворенню шляхом утворення нових гібридних видів. Іноді гібридні форми можуть бути асимільовані шляхом схрещування з батьківськими.

Утворення нового гібридного виду можливе за декількох умов: по-перше, гібриди мають бути життєздатними та фертильними; по-друге, гібриди мають бути просторово або репродуктивно ізольовані від батьківських форм (Chapman et al., 2007).

Ще у першій половині двадцятого століття Феодосієм Добжанським було висунуто припущення про те, що існує щонайменше два типи гібридної стерильності: хромосомний та генний.

Хромосомний тип гібридної стерильності спричинений відмінностями у хромосомному наборі або розбіжностями у взаємному розташуванні алельних генів на хромосомах батьківських форм, які ускладнюють або унеможливають кон'югацію гомологічних хромосом (Dobzhansky, 1936). Генний тип стерильності став відомим під назвою несумісності Добжанського-Мюллера. Причиною цього явища, як вважають, є накопичення мутацій в популяціях, що дивергують. Ці мутації є селективно-нейтральними на звичному генетичному фоні, проте, коли такі мутації комбінуються у геномі гібрида, вони можуть призводити до

зменшення пристосованості та до пригнічення репродуктивної функції гібрида (Orr et al., 2001).

Справедливість ідей Добжанського та Мюллера була підтверджена у численних експериментах зі штучними схрещуваннями на широкому колі досліджуваних об'єктів, зокрема на осах роду *Nasonia* (Breeuwer et al., 1995), рослинах роду *Mimulus* (Fishman et al., 2001) тощо.

Згідно з правилом Холдейна, при гібридизації втрата фертильності відбувається переважно у представників гетерогаметної статі (тобто, у випадку жаб – самців) (Haldane, 1922).

Значна кількість порушень, що зрештою, й зумовлюють гібридну стерильність, відбувається під час мейозу. Одним з вірогідних феноменів, що пояснює такі порушення, є явище мейотичного дрейфу (meiotic drive). Сутність цього явища полягає у порушенні сегрегації гомологічних хромосом під час мейозу. Зокрема, результатом порушення сегрегації гомологічних хромосом може бути продукція сперматозоїдів, що переважно (у 60-100%) несуть Х-хромосоми. Якщо на Х-хромосомі присутні алелі, що не коєволюціонували з іншими хромосомами (що має місце під час гібридизації різних видів), і в результаті стали несумісними, переважна більшість гібридного потомства буде стерильною (McDermott et al., 2010).

Подолати порушення, що виникають у гібридів під час мейозу, дозволяє поліплоїдизація. Гібридизація, що супроводжується тетраплоїдизацією, широко розповсюджена серед рослин і має велике значення для їх еволюції (Polyploidy..., 2015). Хоча серед тварин описані випадки тетраплоїдизації гібридів (Orr, 1990), більш важливим способом подолання гібридної стерильності серед тварин є клональне відтворення (Christiansen et al., 2009).

Серед хребетних тварин клональне відтворення пов'язане з такими явищами, як партеногенез та гіногенез, поліембріонія. При цьому партеногенез може бути як облігатним (зустрічається у деяких представників ряду Лускати:

ящірок роду *Darevskia* та *Aspidoscelis*, змії виду *Rhamphotyphlops braminus* та ін.), так і факультативним (описаний у змії *Python molurus* та акул *Sphyrna tiburo*) (Avisé, 2015).

1.2 Геміклональне відтворення

Ще одним механізмом уникнення гібридної стерильності є геміклональне відтворення. Вперше воно було описане у центральноамериканських прісноводних риб роду *Poeciliopsis* (Miller et al., 1959).

В популяційних системах *Poeciliopsis* відбувається відтворення гібридів (всі з яких є самицями) двох видів - *Poeciliopsis monacha* та *Poeciliopsis lucida*. При формуванні гамет цих гібридних самок, рекомбінації між батьківськими геномами не відбувається, геном *P. lucida* елімінується, натомість до ооцитів потрапляють виключно клональні геноми *P. monacha* (Cimino, 1972). Зигота в цьому випадку отримує один клональний геном від матері, а інший – рекомбінантний - від батька. Потомство, утворене таким чином, матиме геміклональне (напівклональне) походження.

Загалом, для тварин з геміклональним відтворенням характерна елімінація одного з геномів у ході гаметогенезу та передача нерекомбінантного генетичного матеріалу тільки одного з батьків (Miller, Schultz, 1959).

В природних умовах геміклональне відтворення відоме виключно для гібридних форм — паличників *Bacillus* (Bullini et al., 1990), риб *Hypseleotris* (Cytonuclear evidence..., 2011), *Hexagrammos* (Identification..., 2014), їстівної жаби *Pelophylax esculentus* (Berger, 1964; Tunner, 1974) та деяких інших.

1.3 *Pelophylax esculentus* complex як модельний об'єкт для вивчення геміклонального відтворення

P. esculentus (Linnaeus, 1758), або їстівна жаба – гібрид двох поширених на території Європи, та, зокрема, України видів *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) та *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) (Berger, 1964; Plötner, 2005).

Гібридне походження зелених жаб *P. esculentus* було вперше описано польським гідробіологом Лешеком Бергером (Berger, 1964). Подальші дослідження виявили, що гаметогенез диплоїдних *P. esculentus* потребує складних процесів – елімінації одного з геномів, ендоредуплікації клонального геному (Tunner et al., 1991).

Крім диплоїдних *P. esculentus* відомі поліплоїдні (найчастіше – триплоїдні), поширені на значній частині ареалу обговорюваного гібридогенного комплексу.

Відомі триплоїди з композицією геномів LLR та LRR (Plötner, 2005). У всіх вивчених випадках триплоїди виникають внаслідок продукування певними особинами, найчастіше – диплоїдними гібридами (Mutual maintenance..., 2017), диплоїдних гамет. Якщо, наприклад, мова йде про запліднення яйцеклітини з генотипом LR сперматозоїдом L, особина, що виникає внаслідок такого схрещування, має два різні геноми L. Під час гаметогенезу таких гібридів геном R елімінується, а між геномами L може відбуватися рекомбінація (Christiansen et al., 2009).

Системи, де відтворюються *P. esculentus*, названо геміклональними популяційними системами, ГПС (Шабанов та ін., 2009; Шабанов, Литвинчук, 2010). У ГПС загальний процес відтворення об'єднує представників батьківських видів і різні форми гібридів, які з покоління в покоління передають як рекомбінантні, так і клональні геноми. Відомі ГПС різного складу; в них можуть бути поєднані спільним відтворенням як представники обох батьківських видів, так і диплоїдні і поліплоїдні гібриди.

Ми будемо застосовувати класифікацію типів ГПС, позначення яких вказують на таксономічний склад жаб, які входять до них (Шабанов та ін., 2017). Так, літерами E-, R-, та L- позначають присутність відповідно *P. esculentus*, *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Наявність в ГПС поліплоїдних ($3n$ і $4n$) гібридів можна позначати літерою *p*. В цьому випадку система R-E-Ep-ГПС складається з *P. ridibundus*, а також диплоїдних і поліплоїдних (зазвичай, триплоїдних) гібридів. Ті випадки, коли гібриди представлені тільки самками, позначаються додаванням літери *f*, а тільки самців — літери *m*.

Клональна передача геномів батьківських видів через диплоїдних гібридів мала б з часом приводити до їх деградації. Це не відбувається, крім іншого, завдяки схрещуванню гібридів з представниками батьківських видів, геноми яких вони передають. Показано, що рекомбінація, що відбувається у особин батьківського виду, які співіснують з гібридами, знижує частоту фіксації мутацій і, таким чином, сповільнює храповик Мюллера (Som et al., 2007).

В басейні Сіверського Дінця поширені ГПС зелених жаб, де відсутні представники одного з батьківських видів (*P. lessonae*), а гібриди у багатьох місцеперебуваннях представлені як диплоїдами, так і триплоїдами (як з геномною композицією LLR, так і з композицією LRR). Оскільки *P. lessonae* в цьому регіоні відсутні, усі їх геноми (геноми L) передаються через гібридів, *P. esculentus*.

ГПС басейну Сіверського Дінця мають довгу історію дослідження. Перші згадки про знахідку зелених жаб на цій території датуються серединою XIX ст. У роботі Н. Н. Сомова, ці зелені жаби були ідентифіковані як *Rana esculenta* L.

Згодом значний внесок зробив О. М. Нікольський, який розділив *Rana esculenta* на підвиди *R. esculenta* і *R. ridibunda*. Чернов виявив на околицях Харкова представників *R. ridibunda* і *R. lessonae* Cramerano, 1882.

Важливою віхою дослідження зелених жаб Сіверського-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex є роботи Г. А. Лади на території Лівобережної України, у тому числі — в Харківській області. Для визначення жаб

колектив, у якому працював Г. А. Лада, застосовував метод проточної ДНК-цитометрії (Лада, 1995).

На півночі України (зокрема, у Волинській області) зустрічаються ГПС L-E-R-типу, тобто популяційні системи, в яких мешкають *P. lessonae*, *P. ridibundus* і диплоїдні *P. esculentus* (Plötner, 2005). Геміклональні популяційні системи цього типу в цілому та цього регіону зокрема вивчені порівняно гірше.

Таким чином, зелені жаби можуть використовувати одразу два механізми уникнення гібридної стерильності: геміклональне відтворення та поліплоїдизацію. Ця їх особливість разом з високою чисельністю, значною кількістю накопичених даних та зручністю утримання в лабораторних умовах робить зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex зручним об'єктом для дослідження геміклонального відтворення, а також генетичних та екологічних феноменів, пов'язаних з ним.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Методи дослідження

Для отримання сперми жаб широко застосовується стимуляція шляхом зміни тривалості світлового дня (вплив фотоперіодичного ефекту), шляхом зміни температурного режиму (Paniagua et al., 1990), а також стимуляція різноманітними речовинами (у першу чергу, гормонами та їх синтетичними аналогами). Зокрема, використовується гонадотропін-рилізінг гормон (ГнРГ), люліберин, фолікулостимулюючий гормон, хоріальний гонадотропін людини (ХГЛ), бусерелін (агоніст гонадотропін-рилізінг гормону), та гомогенат гіпофізу (Burgost et al., 1955, Environmental influences..., 1979, A gonadotropin..., 1989).

Для отримання зразків сперми використовують два основні методи – посмертний та прижиттєвий. Посмертний передбачає розтин попередньо приспаної тварини та вилучення сім'яників (Byrne et al., 2003), у випадку з прижиттєвим методом зразок уринальної сперми можна отримати після масажу черева особини (Collection..., 2013). До переваг посмертного методу можна віднести те, що він дозволяє використовувати навіть зразки з музейних колекцій за умови попередньої регідrataції (Byrne et al., 2003).

В рамках цього дослідження для гормональної стимуляції самців зелених жаб використовували сурфагон – синтетичний аналог люліберину, гіпоталамічного гонадотропін-рилізінг гормону (Порушення фертильності..., 2014).

Гормональну стимуляцію проводили шляхом ін'єкції 2 мл сурфагону з концентрацією 5мкг/мл до черевної порожнини. Забір зразка сперми проводили через 2 години після ін'єкції з використанням прижиттєвої методики. Після

масажу нижньої частини черева уринальна сперма стікала до чашки Петрі, звідки за допомогою піпетки її переносили до пробірки Еппендорфа. З метою уникнення контамінації, для кожної особини використовували індивідуальні чашки Петрі та пробірки Еппендорфа.

Отримані зразки поміщали у попередньо приготовлений фіксатор Карнуа та центрифугували при 1500 об/хв. Після кожного центрифугування проводили відбір рідини. До осаду додавали 15 μ л льодяної оцтової кислоти. Отриману клітинну суспензію поміщували на розігріте до 60 °C предметне скло шляхом розкапування (Різноманіття розмірів..., 2017).

Дослідження препаратів проводили шляхом світлової мікроскопії. За допомогою USB-камери робили мікрофотографії, на яких згодом з використанням програми PDF-XChange Viewer вимірювали голівки сперматозоїдів (для кожної особини близько 100 сперматозоїдів).

2.2 Обробка результатів

Результати вимірів заносили до таблиці MS Excel. Дані обробляли у програмі Statistica 12 та у програмному середовищі R з використанням багатфакторного дисперсійного аналізу та post hoc тесту Тьюкі.

2.3 Матеріал дослідження

У ході роботи визначили розмірні розподіли сперматозоїдів 43 особин зелених жаб, яких зібрали з червня по вересень 2017 року з ГПС різних типів (табл. 1.).

Типи ГПС, що існують у вищезгаданих локалітетах, були визначені у попередніх дослідженнях (The ploidy..., 2010; Шабанов та ін., 2017). Видову приналежність особин визначали за комплексом морфологічних ознак (Шабанов, 2015).

Плоїдність статевозрілих *P. esculentus*, що походять з Корякова яру (R-E-Ep-ГПС) визначали за середньою довжиною еритроцитів (Цитогенетические особенности..., 2012; Фомичева и др., 2017). Показано, що еритроцити триплоїдних жаб більші за розміром. Межа між диплоїдними та триплоїдними еритроцитами становить приблизно 26 мкм (Бондарева и др., 2012).

Таблиця 1. Досліджені особини зелених жаб

Особини <i>Pelophylax esculentus complex</i>	р. Уди, м. Харків (R-E-ГПС)	Коряків яр, околиці с. Гайдари Харківської області (R-E-Ep-ГПС)	Околиці м. Кремінна Луганської області (R-Epf-ГПС)	оз. Пісочне, Волинська область (L-E-R-ГПС)	Усього
<i>P. ridibundus</i>	1	5	5	2	13
<i>P. lessonae</i>	-	-	-	4	4
<i>P. esculentus</i> (2n)	3	13	-	5	21
<i>P. esculentus</i> (3n)	-	5	-	-	5
Усього	4	23	5	11	43

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Зв'язок між розмірами сперматозоїдів та кількістю ДНК, яку вони містять

Для багатьох організмів показана сильна позитивна кореляція між розмірами клітини та кількістю ДНК, яку вона містить (Gregory, 2001a). Особливо чітко цей зв'язок простежується на еритроцитах (навіть на без'ядерних еритроцитах ссавців) (Gregory, 2001b).

Зв'язок між розмірами сперматозоїдів різних тварин та вмістом ДНК у них вивчений недостатньо. При цьому дослідження сперматозоїдів людини виявило, що за розміром сперматозоїдів (довжині та площі голівки) можна відрізнити сперматозоїди, що несуть X-хромосому від сперматозоїдів, що несуть Y-хромосому (Cui, 1997).

На основі сказаного вище, ми припускаємо наявність кореляції між розміром сперматозоїдів жаб та кількістю ДНК, що вони містять. В такому випадку, сперматозоїди з нормальним хромосомним набором ($n = 13$) мають відрізнятися за розміром від анеуплоїдних або диплоїдних. Ми вважаємо, що аналіз розмірних розподілів сперматозоїдів дозволить виявити ймовірні диплоїдні та анеуплоїдні клітини.

У подальших дослідженнях ми сподіваємося перевірити наше припущення за допомогою прямих методів, що дозволяють встановити кількість ДНК у клітині (зокрема, за допомогою проточної цитометрії).

3.2 Розмірні розподіли сперматозоїдів

Розмірні розподіли сперматозоїдів дають змогу охарактеризувати наявність і характеристики піків, властивих для тієї чи іншої досліджуваної групи. Додаткові піки на розподілі можуть вказувати на наявність сперматозоїдів з аномальною кількістю хромосом (анеуплоїдних та диплоїдних).

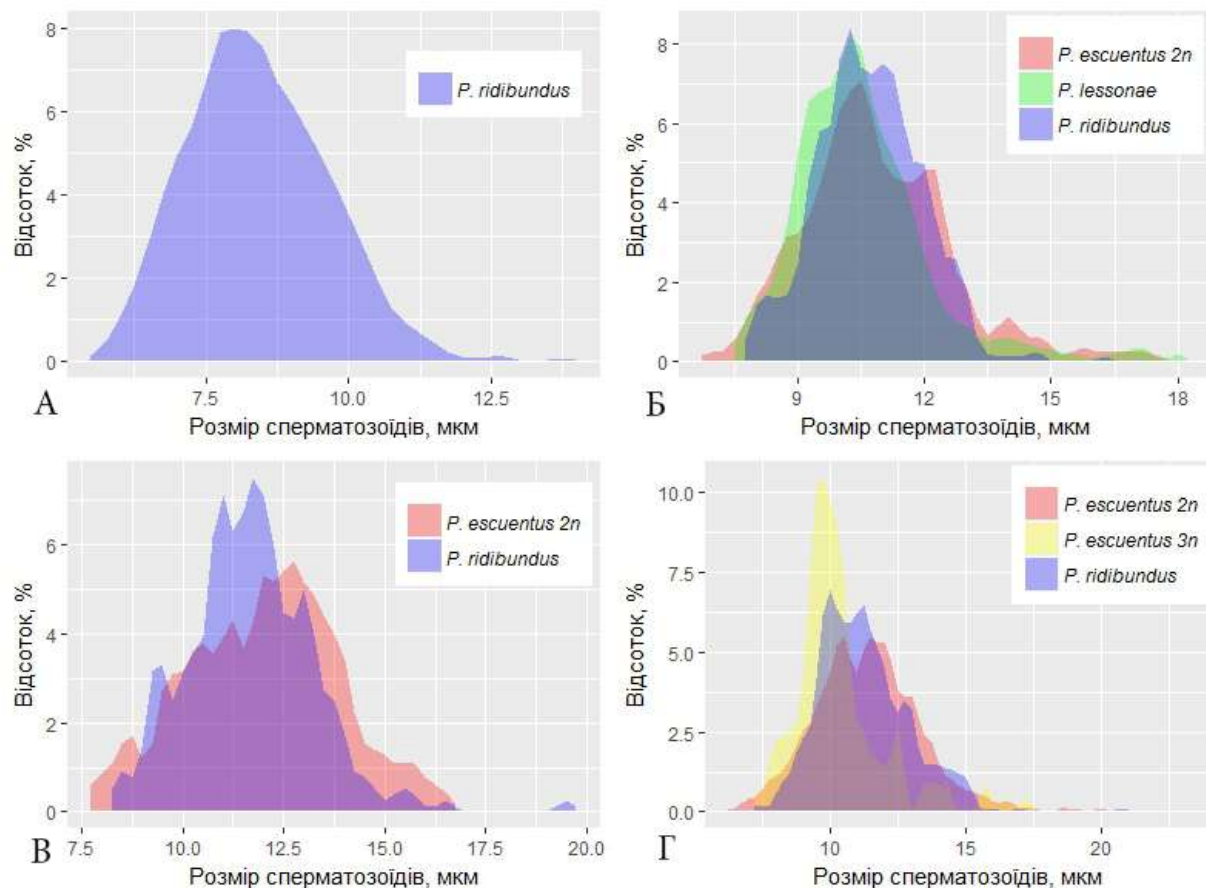


Рис. 1. Розмірні розподіли довжин сперматозоїдів зелених жаб з R-Epf-ГПС з м. Кремінна (А), L-E-R-ГПС з оз. Пісочного (Б), R-E-ГПС з р. Уди (В), та R-E-Epf-ГПС з Корякова яру (Г)

На рис. 1. (Г) на розмірному розподілі сперматозоїдів *P. ridibundus* присутній додатковий пік (у межах 13-15 мкм), що, можливо відповідає диплоїдним сперматозоїдам. При цьому на розмірних розподілах як диплоїдних, так і триплоїдних гібридів, добре вираженого додаткового піку не спостерігається. З огляду на це, можна зробити припущення про ймовірний вклад *P. ridibundus* в

утворення триплоїдних *P. esculentus*. Розмірний розподіл сперматозоїдів триплоїдних *P. esculentus* характеризується суттєвим переважанням сперматозоїдів, близьких за розміром до 10 мкм.

3.3 Багатофакторний дисперсійний аналіз

Багатофакторний дисперсійний аналіз виявив, що тип ГПС, вид, та плоїдність – це фактори, вплив яких на розмір сперматозоїдів зелених жаб є значущим: $p=2,2 \cdot 10^{-16}$, $p \sim 0,005$ і $p=2,2 \cdot 10^{-16}$ відповідно (табл. 2.). При цьому взаємодії факторів не виявлено ($p \sim 0,2$).

Таблиця 2. Результати багатофакторного дисперсійного аналізу

Фактор	Ступені свободи	Сума квадратів	Середньоквадратичне відхилення	F	p
Тип ГПС	3	4498,7	1499,6	529,1	$2,2 \cdot 10^{-16}$
Вид	2	30,2	15,1	5,3	0,0049
Плоїдність	1	256,5	256,6	90,5	$2,2 \cdot 10^{-16}$
Тип ГПС: Вид	2	9,0	4,49	1,6	0,2
Залишок	3648	10339.0	2.83		

3.4 Результати post hoc тесту Тьюкі

Тест Тьюкі свідчить про схожість розмірів сперматозоїдів жаб з одного й того ж самого локалітету (табл. 3.). Так, немає значущої відмінності між значеннями для *P. ridibundus* та *P. esculentus* з R-E-ГПС – $p \sim 0,46$; особливо близькі *P. ridibundus* та *P. esculentus* з R-E-Ер-ГПС – $p \sim 0,99$ (не дивлячись на присутність у цій системі триплоїдів).

Близькі значення демонструють і особини з L-E-R-ГПС: $p \sim 0,8$ для *P. ridibundus* та *P. esculentus*, $p \sim 0,92$ для батьківських видів і $p \sim 0,07$ для *P. lessonae* та *P. esculentus*.

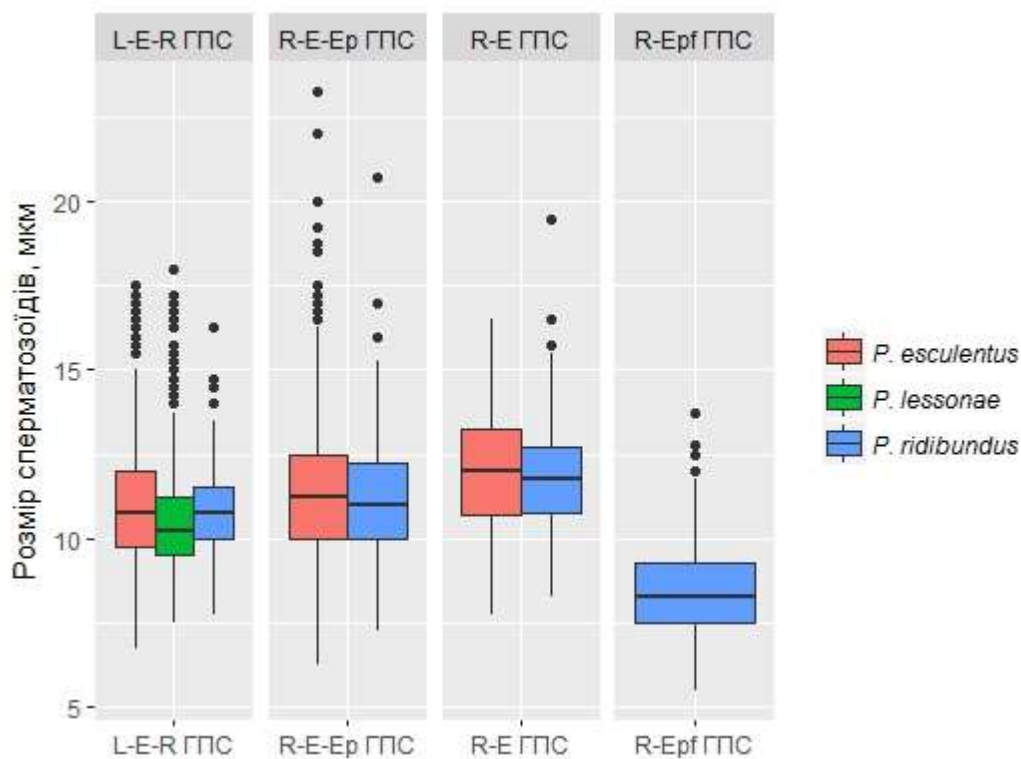


Рис. 2. Порівняння мінливості розмірів сперматозоїдів

Таблиця 3. Результати тесту Тьюкі. Значущі відмінності між групами виділено зеленим кольором

Вид	Тип ГПС	<i>P. ridibundus</i> R-E ГПС	<i>P. ridibundus</i> R-E-Ep ГПС	<i>P. ridibundus</i> L-E-R ГПС	<i>P. ridibundus</i> R-Epf ГПС	<i>P. esculentus</i> R-E ГПС	<i>P. esculentus</i> R-E-Ep ГПС	<i>P. esculentus</i> L-E-R ГПС	<i>P. lessonae</i> L-E-R ГПС
<i>P. ridibundus</i>	R-E ГПС		0,068422	0,000032	0,000032	0,458076	0,088348	0,000034	0,000032
<i>P. ridibundus</i>	R-E-Ep ГПС	0,068482		0,000171	0,000032	0,000032	0,999819	0,035487	0,000032
<i>P. ridibundus</i>	L-E-R ГПС	0,000032	0,000171		0,000032	0,000032	0,000033	0,807664	0,923092
<i>P. ridibundus</i>	R-Epf ГПС	0,000032	0,000032	0,000032		0,000032	0,000032	0,000032	0,000032
<i>P. esculentus</i>	R-E ГПС	0,458076	0,000032	0,000032	0,000032		0,000032	0,000032	0,000032
<i>P. esculentus</i>	R-E-Ep ГПС	0,088348	0,999819	0,000033	0,000032	0,000032		0,001366	0,000032
<i>P. esculentus</i>	L-E-R ГПС	0,000034	0,035487	0,807664	0,000032	0,000032	0,001366		0,075871

Також близькими за розмірами сперматозоїдів виявились жаби, зібрані на території Харківської області (R-E-ГПС, R-E-Ep-ГПС). Не виявлено статистично значущої відмінності при порівнянні батьківських видів ($p \sim 0,68$ для *P. ridibundus*), гібридів з R-E-ГПС та батьківського виду R-E-Ep-ГПС ($p \sim 0,09$). При цьому гібриди даних ГПС демонструють сильну відмінність ($p = 3,2 \cdot 10^{-5}$).

Порівняння між собою інших груп з різних ГПС виявило значущі відмінності ($p < 0,001$).

Як можна побачити з рис. 1. та табл. 3., найбільш відособленою групою є *P. ridibundus* R-Epf-ГПС. Ця група різко ($p = 3,2 \cdot 10^{-5}$) відрізняється від усіх інших. Розміри сперматозоїдів жаб з цієї групи є найменшими, що, можливо пов'язано з пізнім збором особин для дослідження (20 вересня 2017 р.).

ВИСНОВКИ

1. При порівнянні препаратів уринальної сперми зелених жаб з R-Epf-ГПС (м. Кремінна, Луганська обл.), L-E-R-ГПС (оз. Пісочне, Волинська обл.), R-E-ГПС (р. Уди, Харківська обл.) та R-E-Ep-ГПС (Коряків яр, Харківська обл.), встановлено, що найменша мінливість за розміром сперматозоїдів є характерною для триплоїдних *P. esculentus*.
2. Багатофакторний дисперсійний аналіз виявив значущий вплив типу ГПС, з якого походить особина, а також її плоїдності та таксономічної приналежності на розмір сперматозоїдів ($p < 0,001$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бірюк О. В. Цитогенетичні особливості сперматогенезу у диплоїдних і триплоїдних геміклональних міжвидових гібридів *Pelophylax esculentus* complex // дис. на здобуття вченого ступеня канд. біол. наук. за спеціальністю 03.00.15 «Генетика». Київ, 2017. 121 с. (Рукопис).
2. Вибіркова генетична й екологічна смертність різних представників гібридогенного комплексу зелених жаб забезпечує стійкість їхніх геміклональних популяційних систем / Дрогваленко М. О., Кравченко М. О., Макарян Р. М., Степанюк Я. В. [та ін.]. // Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень: мат. V міжнар. наук.-практ. конф.; М-во екології та природ. ресурсів України, НПП «Хотинський» та ін. Чернівці: Друк Арт, 2018. С. 199-202.
3. Лада Г. А. Среднеевропейские зеленые лягушки (гибридогенный комплекс *Rana esculenta*): введение в проблему // Флора и фауна Черноземья. Тамбов, 1995. С. 88–109.
4. Массовая полиплоидия в гибридогенном комплексе *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) на Востоке Украины / Боркин Л. Я., Зиненко А. И., Коршунов А. В., Лада Г. А. [и др.] // Матеріали Першої конференції Українського Герпетологічного Товариства. К.: Зоомузей ННПМ НАНУ, 2005. С. 23–26.
5. Порушення фертильності у міжвидових гібридів зелених жаб із Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex / Боброва А. А., Макарян Р. М., Шейко В. П., Шабанов Д. А. // Біологія та валеологія. 2014. Вип. 16. С. 7-15.

6. Поширення різних типів геміклональних популяційних систем гібридного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) у басейні Сіверського Донця / Шабанов Д. А., Бірюк О. В., Коршунов О. В., Кравченко М. О. // Сучасний стан та охорона природних комплексів в басейні Сіверського Дінця. Мат. наук.-практ. конф. з нагоди 20-річчя НПП “Святі гори”. Святогірськ, ТОВ “Видавництво “Друкарський двір”. 2017. С. 139-144.
7. Різноманіття розмірів сперматозоїдів зелених жаб різних ГПС / Степаненко К. Р., Бірюк О. В., Пустовалова Е. С., Стах В. О. // Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій» (7 – 10 вересня 2017 р., смт Шацьк), Львів: СПОЛОМ, 2017. С 105-109.
8. Устойчивость сперматогенеза и проявления отбора на клеточном и индивидуальном уровнях у незрелых представителей *Pelophylax esculentus* complex / Бирюк О. В., Усова Е. Е., Мелешко Е. В. [и др.] // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. 2016. Вип. 24(1). С. 193-202.
9. Фомичева А. Ю., Лобойко Д. И. Изучение состава гемиклональной популяционной системы зеленых лягушек Корякова яра (Змиевской район Харьковской области) // «Біологія: від молекули до біосфери». Матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених (26 листопада – 1 грудня 2017 р., м. Харків). Х.: ФОП Шаповалова Т. М., 2017. С. 149-150.
10. Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex / Бондарева А. А., Бирик Ю. С., Самило С. М., Шабанов Д. А. // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія Вип. 15, №1008. 2012. С. 116-123.

11. Шабанов Д. А., Коршунов А. В., Кравченко М. О. Які ж зелені жаби населяють Харківську область? Термінологічний і номенклатурний аспекти проблеми // Біологія та валеологія. 2009. Вип. 11. С. 116–125.
12. Шабанов Д. А., Литвинчук С. Н. Зеленые лягушки: жизнь без правил или особый способ эволюции? // Природа. 2010. Вып. 3. С. 29–36.
13. Шабанов Д. А. Еволюційна екологія популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) Лівобережного лісостепу України: автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 — екологія. Дніпропетровськ, 2015. 36 с.
14. A gonadotropin releasing hormone analog induces spermiation in intact and hypophysectomized frogs, *Rana esculenta* / Minucci S., Di Matteo L., Baccari G. C. [et al.] // Experientia. 1989. Vol. 45. P. 1118-1121.
15. Avise J. C. Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals// Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol 112. Issue 29. P. 8867-8873.
16. Berger L., Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species? // Ann. Zool. PAN. 1964. Vol. 22, Issue 13. P. 245-261.
17. Breeuwer J. A., Werren J. H. Hybrid breakdown between two haplodiploid species: the role of nuclear and cytoplasmic genes// Evolution. 1995. Vol. 49. Issue 4. P. 705-717.
18. Bullini L., Nascetti G. Speciation by hybridization in phasmids and other insects// Canadian Journal of Zoology. 1990. Vol. 68. Issue 8. P. 1747-1760.
19. Burgost M. H., Ladman A. J. Effect of purified gonadotropins upon release of spermatozoa in the frog, *Rana pipiens*// Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1955. Vol. 88. Issue 3. P. 484-487.

20. Byrne P. G., Simmons L. W., Roberts J. D. Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs// *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2003. Vol 270 (1528), P. 2079-2086.
21. Chapman M. A., Burke J. M. Genetic divergence and hybrid speciation // *Evolution*. 2007. Vol. 61. Issue 7. P. 1773-1780.
22. Christiansen D. G., Reyer H. U. From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs// *Evolution*. 2009. Vol. 63. Issue 7. P. 1754-1768.
23. Cimino M. C. Egg production, polyploidization and evolution in a diploid allfemale fish of the genus *Poeciliopsis* // *Evolution*. 1972. Vol. 26. P. 294–306.
24. Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lessonae*) / Uteshev V., Shishova N., Kaurova S. et al. // *Russian Journal of Herpetology*. 2013. Vol 20, Issue 2 P. 105-109.
25. Crossing experiments reveal gamete contribution into appearance of di- and triploid hybrid frogs in *Pelophylax esculentus* population systems / Dedukh D. V., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M. [et al.] // *Chromosome Research*. 2015. Vol. 23., Issue 2. P. 380-381.
26. Cui K. H. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis// *Molecular Human Reproduction*. 1997. Vol 3. Issue 1. P. 61-67.
27. Cytonuclear evidence for hybridogenetic reproduction in natural populations of the Australian carp gudgeon (*Hypseleotris*: Eleotridae) / Schmidt D. J., Bond N. R., Adams M., [et al.] // *Molecular Ecology*. 2011 Vol. 20. P. 3367–3380.
28. Dobzhansky T. H. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids// *Genetics*. 1936. Vol. 21. Issue 2. P. 113-135.
29. Environmental influences on hormonally induced spermiation of the bullfrog, *Rana catesbeiana* / Easley K. A., Culley D. D., Horseman N. D. [et al.] // *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 1979. Vol. 207. Issue 3. P. 407-416.

30. Fisher R. A. The genetic theory of natural selection. Oxford Univ. Press, Oxford U.K. 1930. 308 p.
31. Fishman L., Willis J. H. Evidence for Dobzhansky-Muller incompatibilities contributing to the sterility of hybrids between *Mimulus guttatus* and *M. nasutus*// Evolution. 2001. Vol. 55. Issue 10. P. 1932-1942.
32. Gregory T. R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma// Biological reviews. 2001a. Vol. 76. Issue 1. P. 65-101.
33. Gregory T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates// Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2001b. Vol. 27 Issue 5. P. 830-843.
34. Haldane J. B. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals// Journal of genetics. 1922. Vol. 12. Issue 2. P. 101-109.
35. Hamilton W. D. Sex versus non-sex versus parasite// Oikos. 1980. Vol. 35 P. 282–290.
36. Hybridization and speciation / Abbott R., Albach D., Ansell S. et al. // Journal of evolutionary biology. 2013. Vol. 26. Issue 2. P. 229-246.
37. Identification of hemiclinal reproduction in three species of *Hexagrammos* marine reef fishes / Kimura-Kawaguchi M. R., Horita M., Abe S. [et al.] // Journal of fish biology. Vol. 85. Issue 2. P. 189-209.
38. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine / Borkin L. J., Korshunov A. V., Lada G. A., Litvinchuk S. N. [et al.]// Russian Journal of Herpetology, 2004. Vol. 11, No 3. P. 194–213.
39. Maynard Smith J. What use is sex? // J. Theor. Biol. 1971. Vol. 30: p. 319–335.
40. McDermott S. R., Noor M. A. The role of meiotic drive in hybrid male sterility // Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2010. Vol. 365 (1544). P. 1265-1272.
41. Miller R. R., Schultz R. J. All-female strains of the teleost fishes of the genus *Poeciliopsis* // Science. 1959. Vol. 130, P. 1656–1657.

42. Muller H. J. Some genetic aspects of sex // Am. Nat. 1932. Vol. 66. P. 118–138.
43. Mutual maintenance of di- and triploid *Pelophylax esculentus* hybrids in R-E systems: results from artificial crossings experiment / Dedukh D., Litvinchuk S., Rosanov J. [et al.] // BMC evolutionary biology. 2017. Vol. 17 Issue 1.
44. Orr H. A. (1990). "Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants" Revisited// The American Naturalist. 1990. Vol 136 Issue 6. P. 759-770.
45. Orr H. A., Turelli M. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities // Evolution. 2001. Vol. 55. Issue 6. P. 1085-1094.
46. Paniagua R., Fraile B., Saez F. J. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians// Histology and Histopathology. 1990. Vol 5. Issue 3. P. 365-378.
47. Polyploidy and genome evolution in plants / Soltis P. S., Marchant D. B., Van de Peer, [et al.] // Current opinion in genetics & development. 2015. Vol 35. P. 119-125.
48. Som C., Reyer H. U. Hemiclonal reproduction slows down the speed of Muller's ratchet in the hybridogenetic frog *Rana esculenta*// Journal of evolutionary biology. 2007. Vol. 20 Issue 2. P. 650-660.
49. The ploidy and genetic structure of hybrid population of water frogs *Pelophylax esculentus* complex (Amphibia, Ranidae) of Ukraine fauna / Mezhzherin S. V., Morozov-Leonov S. Yu., Rostovskaya O. V. [et al.] // Cytology and Genetics. 2010. Vol. 44, Issue 4. P. 212-216.
50. Tunner H. G., Heppich-Tunner S. Genome Exclusion and Two Strategies of Chromosome Duplication in Oogenesis of a Hybrid Frog // Naturwissenschaften.— 1991. Issue 78. P. 32-34.
51. Tunner H. G. Die klonale struktur einer wasserfroschpopulation // Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch. 1974. Vol. 12. P. 309-314.